

## 論文審査の要旨

報告番号	甲 第 2611 号	氏 名	岡田 誠二
論文審査担当者	主査 口腔解剖学 中村 雅典 副査 口腔生理学 井上 富雄 副査 歯周病学 山本 松男		

(論文審査の要旨)

学位申請論文「Potential role of hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を行った。

【目的】 Potential role of hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor-interacting protein (HPIP) はプレ B 細胞白血病転写因子 (PBX) 蛋白質の co-repressor (抑制補体) である。PBX 蛋白質は Homeobox (HOX) 蛋白質とヘテロ二量体を形成するが、HPIP はその形成を抑制する。また、HPIP は転写レベルで PBX の発現を抑制することから PBX 蛋白質の調節因子と考えられている。近年、HOX 蛋白質の発現異常が肺癌、卵巣癌、乳癌、口腔癌で報告されているとともに、その高発現が予後不良の指標となることが示されてきた。また、HPIP により制御される HOX と PBX 蛋白質が種々の癌の鍵になる可能性と HPIP が肝細胞癌等の増殖や腫瘍形成に関与することが報告されている。そこで、本研究では、HPIP が口腔癌の腫瘍組織発生やがん細胞の機能に関与しているとの仮説を立て、その解析を行った。

【方法】 正常あるいは異形成を含む口腔癌摘出組織を用いて、HPIP と増殖マーカーの Ki-67 の免疫組織染色を行った。In vitro の解析には、口腔扁平上皮癌細胞株 SCC9 と正常細胞株 HaCaT を用い、カルシウムによる分化誘導時における HPIP の機能的役割について siRNA を用いてインボルクリンを指標としてその発現変化を RT-PCR 法によって検討した。HPIP の増殖や浸潤への役割についても同様の方法にて MTT assay と Matrigel transwell assay により解析した。

【結果】 HPIP の発現は異形成と口腔扁平上皮癌で有意に増加していた。In vitro の解析では、HPIP は SCC9 細胞の分化・増殖を抑制したが、HaCaT 細胞では変化はなかった。さらに、HPIP は SCC9 細胞と HaCaT 細胞の両者の浸潤を促進させた。

【考察】 以上の結果から、HPIP は口腔癌の組織発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、HPIP ががん細胞の分化の抑制と浸潤の促進をしていることから、抗癌治療の潜在的なターゲットである可能性があると考えられる。

本論文の審査にあたり副査から多くの質問があり、その一部と回答を以下に示す。  
井上委員の質問とそれらに対する回答：

1. HPIP の発現抑制による Calcium を用いた分化誘導が、正常角化細胞株 (HaCaT) では影響を受けないにもかかわらず、扁平上皮癌では抑制されるのはどのようなメカニズムによるものか。  
(HPIP は PI3K/AKT pathway を活性化して赤芽球の分化に関わることが明らかである。PI3K/AKT

pathway は口腔扁平上皮癌のみならず正常な口腔粘膜上皮細胞にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、HaCaT は 10 % FBS の定常状態下では pAKT の活性化がないことから、定常下における HaCaT 細胞において HP/IP の siRNA によるノックダウンを行っても、結果として HP/IP- PI3K/AKT 経路を介した分化のスイッチには影響を及ぼさなかったためと考えている。)

2. HP/IP の発現抑制による扁平上皮癌での増殖能と浸潤能の低下のメカニズムはなにか。

(miR-148a が HP/IP に抑制的に働くことから、HP/IP の抑制とそれに引き続く AKT や ERK の活性化抑制による miR-148a/HP/IP/AKT・ERK/mTOR pathway を介した浸潤能への関与が考えられる。また、増殖能の低下については、HP/IP が PI3K/AKT 経路を活性化することと実は矛盾しておりその詳細は不明であるが、HOX と PBX はヘテロダイマーを形成し、HP/IP はこのヘテロダイマーの形成に抑制的に働く。この HOX の一種である HOXA1 は口腔癌の増殖を促進していることが報告されていることから、HP/IP は HOXA1 の抑制を介して増殖を負に制御している可能性があると考えている。)

3. カルシウム濃度の上昇による扁平上皮癌の分化誘導メカニズムにはどのようなものがあるか。

(SCC9 と同じ舌癌由来の培養細胞株 SCC4 ではレチノイン酸のみで分化が生じ、カルシウム単独で分化は起こらない。一方、SCC9 においてはカルシウム単独で分化が生じ、レチノイン酸単独で分化は起こらない。これらのことから同一部位由来の扁平上皮癌細胞同士においてもカルシウムによる分化誘導のメカニズムは異なっていることが推察される。現在、SCC9 におけるカルシウムによる分化誘導の詳細なメカニズムについての報告は未だない。)

山本委員の質問とそれらに対する回答：

1. 口腔重層扁平上皮癌株では HP/IP 転写分子の発現において明らかになっている機能は何か。

(これまで HP/IP の機能解析を行った報告はない。本報告においては in vitro の機能解析として、OSCC 培養細胞株における HP/IP の役割を検討し、HP/IP は分化と増殖の抑制と浸潤の促進が明らかとなった。)

2. Ki-67 とはどんな蛋白質で、どのような性質を持っているか。

(Ki-67 は、395 もしくは 345kDa の大きな核内蛋白質で細胞周期の G1、S、G2、M 期で発現する。Ki-67 遺伝子は、P-loop と呼ばれる ATP/GTP binding site motif A を C 末端部に有すること、2 つの nuclear targeting signals を有することが示されているが、未だ生物学的意義や機能的役割は明らかではない。)

3. インボルクリンが分化指標となる根拠と Ca 濃度によってどのように変わるのか。

(正常な皮膚の表皮角質層内にはインボルクリンやフィラグリン等の特有な蛋白質が発現することが知られている。インボルクリンは互いに架橋され角層の強度を高め細胞間脂質構造を支える細胞外構造の形成に関与する。カルシウムイオン環境は、ケラチノサイトの分化に影響を与え、カルシウム濃度を上げるとインボルクリンが誘導されます。また、角層のバリア機能に寄与する細胞間脂質の合成にもカルシウム環境は大きく影響し、ケラチノサイトや扁平上皮癌の分化の指標としてインボルクリンが使われていることから、指標として用いた。)

これらの試問に対する回答は、適切かつ明解であった。また、中村委員は主査の立場から、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認した。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。